论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1164-03

1,25二羟维生素D_3联合他莫西芬对转染VDRE-Tk-ERα表达载体的MDA-MB-231细胞周期和凋亡的影响

郎海滨,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建受1,25二羟维生素D_3调控的雌激素受体α真核表达载体(VDRE-Tk-ERα),并观察其对雌激素受体阴性乳腺癌细胞的细胞周期相分布和凋亡的影响。**方法** 利用PCR法体外构建得到含有4个拷贝VDRE和Tk启动子的VDRE-Tk-ERα表达载体,并将其和空载体质粒分别转染入MDA-MB-231细胞中,通过流式细胞仪检测乳腺癌细胞周期相的分布,用TUNEL法检测细胞凋亡的发生。**结果** 1,25二羟维生素D_3和他莫西芬联合作用较对照组和单独作用组能够显著抑制乳腺癌细胞的周期进程,并能有效诱导肿瘤细胞发生凋亡。**结论** 利用1,25二羟维生素D_3靶控雌激素受体α表达载体联合他莫西芬可以阻止雌激素受体α阴性的MDA-MB-231乳腺癌细胞的周期进程并诱导其发生凋亡,从而使原本对他莫西芬耐受的乳腺癌细胞恢复对其的化疗敏感性。

关键词: 1,25二羟维生素D_3;细胞周期;细胞凋亡;ERα;他莫西芬;MDA-MB-231细胞

中图法分类号: R73-361; R730.23; R737.9 **文献标识码:** A

Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 and Tamoxifen on cell cycle distribution and apoptosis of MDA-MB-231 cells transfected with ERα expression vector containing vitamin D response element

LANG Hai-bin, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 and Tamoxifen on cell cycle distribution and apoptosis of MDA-MB-231 cells transfected with ERα expression vector containing vitamin D response element. Methods The 4 VDRE-Tk sequence of VDRE-pGL3 reporter vector was cloned into ERα/pcDNA3.1+ vector and then was transfected into MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$ breast cancer cells were treated with 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 and Tamoxifen to observe their pro-apoptotic effect by TUNEL and to determine whether cell cycle progression could be repressed by FCM. Results As compared with control group, MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$ cells at G_0/G_1 phase increased profoundly after treated with 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 and Tamoxifen for 72 h. Meanwhile, 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 and Tamoxifen synergistically induced the apoptosis of MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$ cells. Conclusion Transfection of VDRE-Tk-ERα expression vector into ERα-negative breast cancer cells could effectively recover its responsiveness to Tamoxifen under the induction of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 by blocking the cell cycle progression and inducing apoptosis.

Key words: 1, 25-dihydroxyvitamin D_3; cell cycle; apoptosis; ERα; Tamoxifen; MDA-MB-231

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤之一,内分泌治疗是目前乳腺癌综合治疗中的首要措施,而以他莫西芬(Tamoxifen,TAM)为代表的选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERM)是目前临床上治疗乳腺癌的最具代表性的内分泌治疗药物,但由于其仅能使部分雌激素受体阳性的乳腺癌患者受益,而雌激素受体阴性的患者极易对其产生耐药性[1],从而限制了其疗效的发挥。1,25二羟维生素D_3(以下简称$VitD_3$)属于类固醇类化合物,除了其传统的钙、磷调节功能以外,在包括乳腺肿瘤、白血病以及前列腺肿瘤的治疗方面也发挥了极为重要的作用[2]。本研究拟利用转染入$VitD_3$依赖的雌激素受体α表达载体的雌激素受体阴性的MDA-MB-231乳腺癌细胞为研究对象,观察$VitD_3$联合TAM对乳腺癌细胞

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371217)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371217)

作者简介: 郎海滨(1974-),男,山西省太原市人,博士研究生,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68753361, E-mail: cqlang@sohu.com

通讯作者: 糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期: 2005-10-28;**修回日期:** 2006-01-12

的周期进程以及凋亡的影响。

1　材料与方法

1.1　质粒

含 4 个拷贝 VDRE 的报告质粒(VDRE-Tk/pGL3)由德国杜塞尔多夫大学 Carlberg 教授惠赠;含人雌激素受体 α 基因的真核表达载体(pcDNA3.1 +/ERα)由瑞士巴塞尔大学 Fournier 教授惠赠。

1.2　细胞及细菌菌株

MDA-MB-231 细胞(人雌激素受体阴性乳腺癌细胞株)购自中科院上海细胞所;普通 JM109 大肠杆菌菌株为本室保存;JM109 超级感受态菌株购自大连宝生物公司。

1.3　主要试剂

Ex-*Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、*Nde* Ⅰ以及 *Bgl* Ⅱ限制性内切酶购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒购自 Promega 公司;胶回收试剂盒购自 Omega 公司;脂质体转染试剂盒购自 Promega 公司;DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司;新生牛血清购自天津 TBD 公司;G418 购自 Calbiochem 公司;1,25 二羟维生素 D_3 购自 Fluka 公司;他莫西芬购自 Sigma 公司;鼠抗人 ERα 单克隆抗体、兔抗鼠荧光二抗均购自 Santa Cruze 公司。

1.4　实验方法

1.4.1　VDRE-Tk-ERα 表达载体的构建及转染　参照《分子克隆》第 3 版[3]相关方法,利用 PCR 技术将 VDRE-Tk/pGL3 质粒上的维生素 D_3 反应元件和 Tk 启动子克隆到 pcDNA3.1 +/ERα 表达载体上游启动子区域并替换其本身的 CMV 启动子,最终得到 VDRE-Tk-ERα 真核表达载体并测序鉴定。参照 Promega Tfx-20 真核细胞脂质体转染试剂盒的说明,将构建成功的 VDRE-Tk-ERα 质粒和 pcDNA3.1 + 空载体分别转染入处于对数生长期的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中。以 400 μg/ml 的 G418 进行筛选,7 d 后,待对照组细胞完全死亡后,以 200 μg/ml的 G418 维持筛选 3 周,传代并冻存备用。

1.4.2　$VitD_3$ 对转染 VDRE-Tk-ERα 表达载体的 231 细胞(MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞)ERα 的诱导表达　将转染空载体的 MDA-MB-231 细胞和 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞以 5×10^4/ml 的浓度接种于铺有盖玻片的 24 孔板中,分别以 1.0×10^{-7}、5.0×10^{-7}、10.0×10^{-7} mol/L 浓度的 $VitD_3$ 处理 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞 12、24、48 h,同时设置未处理组为对照组,转染了空载体质粒的 231 细胞为阴性对照。收获细胞后,参照 ERα 抗体试剂说明书操作,最后于激光共聚焦显微镜下观察实验结果,并计算出各组的平均荧光强度。

1.4.3　$VitD_3$ 和 TAM 对 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞周期相分布的影响　将转染空载体的 MDA-MB-231 细胞和 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞以 5×10^4/ml 的浓度接种于培养瓶中,分别以 5.0×10^{-7} mol/L 浓度的 $VitD_3$,5×10^{-6} mol/L 的 TAM 单独或联合处理 24、48、72 h,同时设置未处理组为对照。收获细胞,并用 75% 乙醇固定细胞后用流式细胞仪检测细胞周期相的分布。

1.4.4　$VitD_3$ 和 TAM 对 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞凋亡的影响　将 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞以 5×10^4/ml 的浓度接种于铺有盖玻片的 24 孔板中,分别以 5.0×10^{-7} mol/L 浓度的 $VitD_3$,5×10^{-6} mol/L 的 TAM 单独或联合处理 72 h,同时设置未处理组为对照。参照 Roche 公司 TUNEL 试剂说明书进行实验,用普通光学显微镜观察阳性结果,并计算出各组的凋亡率。

1.5　统计学处理

采用两样本率比较的 χ^2 检验。

2　结果

2.1　$VitD_3$ 对 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞 ERα 的诱导表达的影响

MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞在蓝色激光激发下细胞整体呈现绿色荧光,尤其以胞核最为明显,未经 $VitD_3$ 处理的转染细胞荧光强度较低。经 1.0×10^{-7} mol/L 的 $VitD_3$ 处理 12 h 后即可观察到细胞内荧光强度增大,并随着 $VitD_3$ 处理浓度的提高和作用时间的延长而增大,表明 $VitD_3$ 可以通过 VDRE-Tk 启动子调控下游目的基因高效表达,证实载体的构建和转染是成功的。

2.2　$VitD_3$、TAM 单独或联合作用对 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞周期相分布的影响

MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞经 $VitD_3$、TAM 单独或联合处理 24 ~ 72 h 后,流式细胞仪检测结果显示,联合处理组 G_0/G_1 期细胞所占比例与对照组相比明显升高,至 72 h 后,联合处理组 G_0/G_1 期细胞已占细胞总数的 78.86%,S 期和 G_2/M 期细胞显著减少,提示细胞周期进程被阻遏于 G_0/G_1 期(图 1)。而单独处理组细胞周期分布则无明显变化。

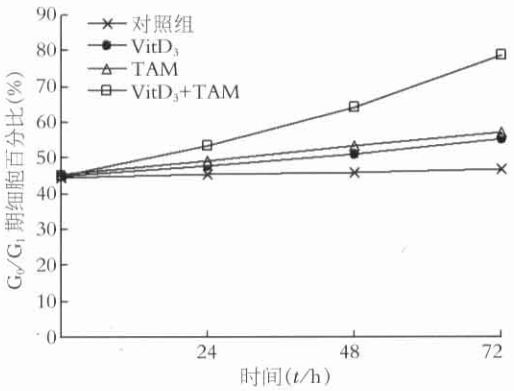
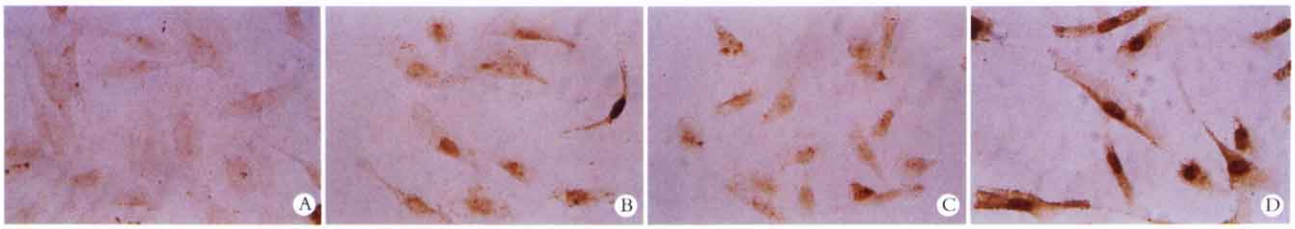


图 1　$VitD_3$、TAM 单独或联合处理 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞后细胞周期相的分布

2.3　$VitD_3$、TAM 单独或联合作用对 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞凋亡的影响

通过 TUNEL 检测显示,MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$细胞经 $VitD_3$ 和 TAM 单独或联合处理 72 h 后,各组均有部分细胞发生了凋亡,尤其是联合处理组,其细胞凋亡率达到了 25.6%,显著高于对照组和单独处理组($P<0.01$),而单独处理组的细胞凋亡率 $VitD_3$ 组仅为 5.8%,TAM 组为 7.6%(图 2)。提示 $VitD_3$ 和 TAM 联合作用能够较单独作用更有效地诱导 MDA-MB-231$^{VDRE\text{-}ER\alpha}$乳腺癌细胞发生凋亡,从而起到抑制肿瘤的作用。



A：对照组；B：$VitD_3$处理72 h；C：TAM处理72 h；D：TAM + $VitD_3$处理72 h

图2 $VitD_3$、TAM单独或联合处理MDA-MB-231$^{VDRE-ER\alpha}$细胞72 h后细胞凋亡情况 （TUNEL×400）

3 讨论

他莫西芬(TAM)是目前临床应用最广泛最有效的内分泌治疗药物，也是术后辅助治疗的常用药物。1977年美国FDA通过批准TAM用于临床治疗进展期乳腺癌，几年后用于原发性乳腺癌的辅助治疗[4]。与此同时，大量的临床和实验室证据显示，由于相当部分的乳腺癌患者的肿瘤细胞雌激素受体缺失，使得癌细胞对作为抗雌激素的TAM的敏感性大大降低并产生耐药性，从而限制了其临床应用。$VitD_3$作为维生素D在体内的生物活性形式，可通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导其发生凋亡的机制来发挥其抗肿瘤的作用[5]，但鉴于其易导致高钙血症的副作用，研究人员遂将其与其他抗肿瘤药物联合使用以降低其作用剂量，并在体内外实验中证实了这种方法的有效性[6]。有研究指出，在雌激素受体α阳性的乳腺癌细胞中，$VitD_3$可通过破坏ERα介导的信号通路来抑制乳腺癌的增殖，实验室研究也证实了$VitD_3$可以通过调控细胞周期相关蛋白的表达和活性从而有效地抑制雌激素受体α阳性的乳腺癌细胞的增殖活性。而另一方面，研究还表明虽然人体维生素D_3受体(VDR)基因的调控序列中并没有雌激素反应元件(ERE)的存在，但其表达仍然受到雌激素受体的调控，推测雌激素受体可能通过其启动子区域的Sp-1和AP-1位点发挥其对VDR的表达调控作用[7]。由此可以看出，虽然$VitD_3$的抗肿瘤效应并非完全依赖雌激素受体的存在[8]，但雌激素受体的缺失仍可导致肿瘤细胞对$VitD_3$化疗敏感性的降低。虽然增加$VitD_3$的作用剂量可以在一定程度上弥补这一不足，但对患者而言，过高的$VitD_3$浓度极易导致高钙血症的发生，从而带来一系列严重的毒副作用。

鉴于此，本研究通过构建含有VDRE和Tk启动子的雌激素受体α表达载体，并将其转染入雌激素受体α阴性的MDA-MB-231乳腺癌细胞中，从细胞周期相的分布可以看出，与单独作用组和对照组相比，在经过$VitD_3$和TAM的联合处理72 h后，MDA-MB-231$^{VDRE-ER\alpha}$细胞大部分被阻止在G_0/G_1期，S期和G_2/M期细胞比例则显著下降。与此同时，与对照组相比，部分联合处理组的细胞发生了凋亡，而相同剂量的单独处理组的凋亡发生率明显低于联合处理组。综上所述，我们认为通过构建1,25二羟维生素D_3靶控雌激素受体α表达载体，从而使雌激素受体α的表达受控于外源性$VitD_3$，一方面可以使MDA-MB-231乳腺癌细胞恢复对TAM的化疗敏感性，同时也可以减少$VitD_3$的作用剂量，还同时达到了有效抑制肿瘤细胞增殖和诱导其发生凋亡的作用，对将来临床上化疗结合基因疗法治疗TAM耐药的乳腺肿瘤提供了非常有益的思路。

参考文献：

[1] SWAIN S M. Tamoxifen for patients with estrogen receptor-negative breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(18 Suppl): 93S-97S.

[2] KOSHIZUKA K, KOIKE M, ASOU H, *et al*. Combined effect of vitamin D_3 analogs and paclitaxel on the growth of MCF-7 breast cancer cells *in vivo*[J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 53(2): 113-120.

[3] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京：科学出版社, 2002: 96-99, 627-633.

[4] LANGAN-FAHEY S M, JORDAN V C, FRITZ N F, *et al*. Clinical pharmacology and endocrinology of long-term tamoxifen therapy[M]// JORDAN V C. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison: University of Wisconisin Press, 1994: 27-56.

[5] GOLOVKO O, NAZAROVA N, TUOHIMAA P. Vitamin D-induced up-regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) in prostate cancer cells[J]. Life Sci, 2005, 77(5): 562-577.

[6] GAVRILOV V, STEINER M, SHANY S. The combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and a non-steroid anti-inflammatory drug is highly effective in suppressing prostate cancer cell line (LNCaP) growth[J]. Anticancer Res, 2005, 25(5): 3425-3429.

[7] WIETZKE J A, WELSH J. Phytoestrogen regulation of a Vitamin D_3 receptor promoter and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 actions in human breast cancer cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 84(2-3): 149-157.

[8] ELSTNER E, LINKER-ISRAELI M, SAID J, *et al*. 20-epi-vitamin D_3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1995, 55(13): 2822-2830.

（编辑 陈聪连）